



(51) 国際特許分類6 C12Q 1/26, C12N 9/62		A1	(11) 国際公開番号 WO98/48043												
			(43) 国際公開日 1998年10月29日(29.10.98)												
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/01904		(74) 代理人 弁理士 長谷川芳樹, 外(HASEGAWA, Yoshiki et al.) 〒104-0031 東京都中央区京橋二丁目13番10号 京橋ナショナルビル6F 創英国際特許事務所 Tokyo, (JP)													
(22) 国際出願日 1998年4月24日(24.04.98)															
(30) 優先権データ 特願平9/107106 1997年4月24日(24.04.97) JP 特願平10/90836 1998年3月18日(18.03.98) JP 特願平10/90837 1998年3月18日(18.03.98) JP		(81) 指定国 JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).													
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 京都第一科学 (KYOTO DAIICHI KAGAKU CO., LTD.)[JP/JP] 〒601-8045 京都府京都市南区東九条西明田町57番地 Kyoto, (JP)		添付公開書類 国際調査報告書 請求の範囲の補正の期限前の公開；補正書受領の際には再公開される。													
(72) 発明者；および (75) 発明者／出願人 (米国についてのみ) 石丸 香(ISHIMARU, Kaori)[JP/JP] 大石勝隆(OOISHI, Katsutaka)[JP/JP] 福家博司(FUKUYA, Hiroshi)[JP/JP] 岡村明彦(OKAMURA, Akihiko)[JP/JP] 〒601-8045 京都府京都市南区東九条西明田町57番地 株式会社 京都第一科学内 Kyoto, (JP)															
(54)Title: METHOD FOR ENZYMATICALLY ASSAYING SACCHARIFICATION PROTEIN															
(54)発明の名称 糖化タンパク質の酵素的測定方法															
(57) Abstract FAOD (fructosylamino acid oxidase) is reacted with a sample containing a saccharification protein after or while treating the sample with protease XIV or a protease derived from the genus Aspergillus to determine the amount of oxygen consumed in the FAOD reaction or the amount of the reaction product, thereby assaying saccharification protein. According to the above method, the saccharification protein is fragmented by the above protease while inhibiting the decomposition of degradation of FAOD per se, thus facilitating bonding of the protein to FAOD, which improves the detection sensitivity															
		<table border="1"> <caption>Data points from the graph</caption> <thead> <tr> <th>糖化率 (%)</th> <th>OD555</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>11.5</td> <td>0.04</td> </tr> <tr> <td>17.5</td> <td>0.10</td> </tr> <tr> <td>19.0</td> <td>0.11</td> </tr> <tr> <td>22.5</td> <td>0.15</td> </tr> <tr> <td>25.5</td> <td>0.21</td> </tr> </tbody> </table> <p>a ... Saccharification (%)</p>		糖化率 (%)	OD555	11.5	0.04	17.5	0.10	19.0	0.11	22.5	0.15	25.5	0.21
糖化率 (%)	OD555														
11.5	0.04														
17.5	0.10														
19.0	0.11														
22.5	0.15														
25.5	0.21														

(57)要約

糖化タンパク質を含有する試料を、プロテアーゼ XIV またはアスペルギルス属 (Aspergillus) 由来のプロテアーゼで処理した後 (あるいは前記プロテアーゼで処理しつつ)、前記試料に F A O D (フルクトシルアミノ酸オキシゲナーゼ) を反応させ、前記 F A O D 反応において消費される酸素の量または前記反応の生成物の量を測定することにより、糖化タンパク質を測定する。

上記方法により F A O D 自体の分解を抑制しつつ、前記糖化タンパク質が上記プロテアーゼにより断片化処理され、F A O D への結合が容易となって検出感度が向上する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SK	スロバキア
AM	アルメニア	FR	フランス	LS	レソト	SL	シエラレオネ
AT	オーストリア	GA	ガボン	LT	リトアニア	SN	セネガル
AU	オーストラリア	GF	フランス領	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
AZ	アゼルバイジャン	GL	グリーンランド	LV	ラトヴィア	TD	チャド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GR	ギリシャ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BB	バルバドス	GU	グアム	MD	モルドバ	TJ	タジキスタン
BE	ベルギー	HN	ホンジュラス	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BF	ブルキナファソ	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア	TR	トルコ
BG	ブルガリア				共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HE	ヘンリクス	ML	マリ	UA	ウクライナ
BS	バハマ	HR	クロアチア	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
BT	ブータン	IO	インド洋領土	MR	モーリタニア	US	米国
BY	ベラルーシ	IL	イスラエル	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CA	カナダ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	VN	ベトナム
CC	中央アフリカ	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CG	コンゴ	IT	イタリア	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CH	スイス			NO	ノルウェー		
CI	コートジボワール	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CM	コンゴ	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CN	中国	KG	キルギス	PT	ポルトガル		
CO	コロンビア	KH	北朝鮮	RO	ルーマニア		
CZ	チェコ	KR	韓国	RU	ロシア		
DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	SD	スーダン		
DK	デンマーク	LR	ラトヴィア	SE	スウェーデン		
				SG	シンガポール		
				SI	スロベニア		

## 明 細 書

## 糖化タンパク質の酵素的測定方法

## 5 技術分野

本発明は、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ（以下、「FAOD」という）を用いる糖化タンパク質の測定方法に関し、さらに詳しくは、より正確且つ高感度に糖化タンパク質を測定することができ、しかも臨床検査等に容易に利用可能な糖化タンパク質の測定方法、および前記測定方法に好適に使用可能なプロテアーゼに関する。

## 背景技術

糖化タンパク質は、タンパク質を構成するアミノ酸のアミノ基と、アルドース等の還元糖のアルデヒド基とが非酵素的且つ非可逆的に結合して生成される物質である。このような非酵素的且つ非可逆的な結合反応は「アマドリ転位」とも称されるため、上記の糖化タンパク質は「アマドリ化合物」と称されこともある。

このような糖化タンパク質の生成速度は、一般に、前記糖化タンパク質を与えるべき「原料」たる、タンパク質と還元糖の濃度、これら両者の接触時間、ないしは糖化反応時の温度に依存する。当然ながら、上記タンパク質と還元糖の量が多い程、両者の接触時間が長い程、あるいは（蛋白質の変性が起きない程度で）温度が高い程、反応生成物たる糖化タンパク質の生成速度は大きくなり、また、その生成量は多くなる。

他方、生体中では、前記の糖化反応の原料たるタンパク質の半減期によって糖化タンパク質の濃度が異なるため、前記糖化タンパク質の濃度を測定することにより、前記生体に関する種々の情報を得ることができる。

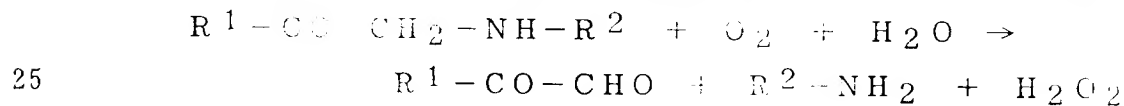
上記糖化タンパク質の中でも、例えば、血液中のヘモグロビンが糖化されたフルクトシルアミン誘導体はグリコヘモグロビン、アルブミンが糖化された誘導体はグリコアルブミン、血液中のタンパクが糖化された誘導体の還元能はフルクトサミンと呼ばれる。

5       これらの糖化されたタンパク質誘導体の血中濃度は、生体における過去の一定期間の平均血糖値を反映しているため、前記糖化タンパク質誘導体の血中濃度の測定値は、糖尿病の症状の診断及び症状の管理の重要な指標となり得る、したがって、糖化タンパク質の血中濃度を測定する手段の確立は、臨床の面からも極めて有用である。

10       従来より、試料中の糖化タンパク質は、例えば、糖化タンパク質に酸化還元酵素を作用させ、酸素の消費量又は前記酸化還元酵素の作用に基づく生成物（例えば、過酸化水素）の産生量を測定することにより、測定できることが知られている（例えば、特公平5-33997号公報、特公平6-65300号公報、特開平2-195900号公報、特開平3-155780号公報、特開平4-4874号公報、特開平5-192193号公報、特開平6-46846号公報、特開平7-289253号公報、特開平8-154672号公報、特開平8-336386号公報を参照）。

15       また、糖尿病の診断を目的とする糖化タンパク質の測定方法も知られている（特開平2-195899号公報、特開平2-195900号公報、特開平5-192193号公報（EP 0 526 150 A）、特開平6-46846号公報（EP 0 576 838 A）、特開平7-289253号公報、特開平8-154672号公報、特開平8-336386号公報を参照）。

一般に、糖化タンパク質を基質とする酵素反応は、以下の式で示される。



25       （上記式中、 $\text{R}^1$ は還元糖のアルドース残基を表し、 $\text{R}^2$ はアミノ酸、タンパ

ク質またはペプチド残基を表す。)

上記の糖化タンパク質を基質とする反応を触媒する酵素として、種々の微生物由来のFAOD (フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ) が知られている。

本出願人も、既に、フサリウム属(*Fusarium*)、ギベレラ属(*Gibberella*)、ペニシリウム属(*Penicillium*)等に属する菌由来のFAODを得て、これらが糖化タンパク質の測定に有用であることを示している(特開平7-289253号公報、特開平8-154672号公報、特開平8-336386号公報を参照)。

上記した種々のFAODのうち、フサリウム・オキシスポルムS-1F4 (*Fusarium oxysporum* S-1F4) が産生するFAOD (以下「FAOD-S」と称する)、及びギベレラ・フシクロイ (*Gibberella fujikuroi*) が産生するFAOD (以下「FAOD-G」と称する) は、フルクトシルリジン及び/またはフルクトシルポリリジンに対して活性を有することから、ヒト血清またはヒト糖化アルブミンの測定に有用であることが判明している(特開平7-289253号公報)。

従って、これらのFAODを用いる糖化タンパク質の測定方法が確立されれば、前記FAOD法を汎用の検査装置に適応させることもでき、従来法であるHPLC法や抗体法に比べて安価に短時間で測定を行うことが期待される。更に、前記FAOD酵素が有する特異性を利用して、正確に生体成分中の糖化タンパク質を求めることも可能となるため、FAOD酵素法による糖化タンパク質の測定は、健康診断におけるマス・スクリーニング検査や糖尿病患者の治療マーカーとしての期待が大きい。

FAODによる糖化タンパク質の測定においては、基質たる糖化タンパク質が、酵素(触媒)たるFAODの基質結合部位に効率良く結合することが好ましい。したがって、酵素反応の速度を増大させるためには、前記結合の効率を増大させるための基質のデザインが重要となる。これは、FAODが糖化タンパク質よりも(より分子量が小さい)糖化ペプチドに対する活性が高く、しか

も糖化ペプチドよりは（更に分子量が小さい）糖化アミノ酸に対する活性が高い傾向を有するからである。

FAODに関しては、生体成分中に存在する糖化タンパク質をプロテアーゼを用いて小断片化する（分子量を低下させる）ことにより、前記FAOD酵素の反応速度が増大することが周知である。上述したように、FAODの基質との親和性の点からは糖化アミノ酸が最も好ましいため、糖化タンパク質を全てアミノ酸に消化・断片化するプロテアーゼを用いることも理論的には可能であるか、前記アミノ酸への断片化処理に著しく時間を要するという欠点がある。したがって、FAODの基質との親和性と、消化断片化の反応時間とのバランスの点からは、糖化タンパク質中に存在する糖化されたアミノ酸部位を選択的に切断するプロテアーゼを用いることが好ましい。

しかしながら、プロテアーゼの種類は数多く、しかもこれと組み合わせるべきFAODの種類によっては、FAOD酵素反応に好適な基質の大きさが異なる場合もあり得るため、プロテアーゼとFAODの好適な組み合わせは、実際には、かなり限定されたものとなる。

前記技術分野では、種々のプロテアーゼが、ある種のFAODとの組み合わせにおいて有用であることが知られており、これらのプロテアーゼはエンド型及びエキソ型プロテアーゼに大別されている。

前者のエンド型プロテアーゼはタンパク質の内部から分解する酵素であり、トリプシン、 $\alpha$ -キモトリプシン、ズブチリシン、プロティナーゼK、パパイン、カテプシンB、ペプシン、サーモリシン、プロテアーゼXIV、プロテアーゼXVII、プロテアーゼXXI、リジルエンドペプチダーゼ、プロレザー、プロモラインF等が例示される。

他方、後者のエキソ型プロテアーゼはペプチド鎖の端から順に分解する酵素であり、アミノペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼ等が例示される。

特開平5-192193号公報には、糖化タンパク質の測定に有用なプロテ

アーゼとして、プロテイナーゼK、プロナーゼE、アナナイン、サーモリシン、ズブチリシン、牛脾臓プロテアーゼ類が記載されている。実際には、特開平5-192193号に記載されているプロテアーゼは、試料中に存在する糖化タンパク質の断片化処理を行った後、前記プロテアーゼの活性を不活性化させるために55℃で30分間のインキュベーションに供される。このようにプロテアーゼを不活性化させる理由は、次の糖化タンパク質-F A O D反応の過程における「触媒」たるF A O D自体が、プロテアーゼによって断片化処理されてしまうのを抑制ないし防止するためである。

「触媒」たるF A O D自体が断片化処理されてしまうと、当然ながら、糖化タンパク質へのF A O Dの作用に基づいて消費される酸素量または生産される過酸化水素量が少なくなるため、結果として、糖化タンパク質の検出感度が低下する。また、このようなF A O Dの断片化は、糖化タンパク質の測定結果自体の精度にも影響を及ぼすため、F A O Dと組み合わせてプロテアーゼを使用する限り、前記プロテアーゼの不活性化処理は、通常は必須の操作とされていた。

しかしながら、上述したように、既知のプロテアーゼから上記の条件（F A O Dとの好適なマッチング）を満たすプロテアーゼを選択することは容易ではない。例えば、特公平5-33997号公報では、具体的なプロテアーゼは記載されておらず、また特開平5-192193号では、デブリオマイセス属の菌由来のケトアミノキシダーゼと共に用いるプロテアーゼ（プロテイナーゼK、プロナーゼE）が開示されているにすぎない。

すなわち、本発明者らの実験によれば、実際に上記の特開平5-192193号に記載されているプロテアーゼを用いて、試料中に存在する糖化タンパク質の処理を行い、55℃で30分間プロテアーゼを不活性化した後、F A O Dを反応させると、反応生成物である過酸化水素量または消費される酸素量が少ないため、結果として検出感度が充分ではないことが判明している。

プロテアーゼは、加熱による熱変性以外にも、インヒビターの添加によって不活性化することができるが、プロテアーゼとインヒビターとの組み合わせの中には、目的とするプロテアーゼの不活性化を完全に達成できない（ある程度プロテアーゼ活性が残る）組み合わせも存在する。

5       上記したプロテアーゼの不活性化は、基質が結合すべきプロテアーゼ酵素の活性中心にインヒビターが結合することに基づく。インヒビターを酵素の活性中心に結合させるためには、プロテアーゼ反応終了後、インヒビターを添加してから一定の温度条件下で一定時間反応させなければならない。したがって、  
10       このような不活性化反応時間の分だけ、糖化タンパク質の測定全体に要する時間は長くなる。

      本発明の目的は、上述したような従来技術の問題点を解消することが可能な糖化タンパク質の酵素的測定方法、ないし前記測定方法に好適に使用可能な酵素を提供することにある。

15       本発明の他の目的は、より正確且つ高感度に糖化タンパク質を測定することができる糖化タンパク質の測定方法、ないし前記測定方法に好適に使用可能な酵素を提供することにある。

#### 発明の開示

20       本発明者らは鋭意研究の結果、特定のプロテアーゼが、生体成分中の糖化タンパク質（例えば、糖化アルブミン）測定に好適なF A O Dと種々の点で良好なマッチングを与えて、正確且つ高感度の糖化タンパク質測定を可能とし、上記の目的達成に極めて効果的であることを見出した。

25       本発明のプロテアーゼは上記知見に基づくものであり、より詳しくは、試料中の糖化タンパク質を測定するに際しF A O D（フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ）と組み合わせて使用されるプロテアーゼであることを特徴とするものである。



本発明によれば、更に、糖化タンパク質を含有する試料に F A O D を作用させる糖化タンパク質の測定方法であって、前記糖化タンパク質を酸性条件下でプロテアーゼ処理することを特徴とする糖化タンパク質の測定方法が提供される。

- 5       本発明によれば、更に、糖化タンパク質を含有する試料にプロテアーゼおよび F A O D を作用させる糖化タンパク質の測定方法であって、前記プロテアーゼとしてアスペルギルス属 (*Aspergillus*) 由来のプロテアーゼを用いることを特徴とする糖化タンパク質の測定方法が提供される。

- 10       本発明によれば、更に、糖化タンパク質を含有する試料にプロテアーゼおよび F A O D を作用させる糖化タンパク質の測定方法であって、前記プロテアーゼとしてプロテアーゼ XIV を用いることを特徴とする糖化タンパク質の測定方法が提供される。

#### 図面の簡単な説明

- 15       図 1 は、後述する実施例において、糖化アルブミンの濃度と吸光度との関係(糖化アルブミン測定—アルブミン試薬)を求めた結果を示すグラフである。

図 2 は、実施例において、プロテアーゼ相対活性の p H 依存性 (*A.melleus* BP-6277 プロテアーゼの至適 p H) を求めた結果を示すグラフである。

- 20       図 3 は、実施例において、プロテアーゼ相対活性の温度依存性 (*A.melleus* BP-6277 プロテアーゼの温度依存性)を求めた結果を示すグラフである。

図 4 は、実施例において、市販のプロテアーゼ「スミチーム MP」と F A O D-S との組み合わせを用いて、H S A の糖化率を測定した結果 (スミチーム MP / F A O D-S による糖化率の測定) を示すグラフである。

- 25       図 5 は、実施例において得たプロテアーゼと F A O D-S との組み合わせを用いて、H S A の糖化率を測定した結果 (*A.melleus* BP-6277 / F A O D-S による糖化率の測定) を示すグラフである。

図6は、実施例において得た酸性プロテアーゼのpH5（至適pH）における活性値を100として、各pHにおける活性値を相対値で示したグラフである。

図7は、実施例において得た酸性プロテアーゼの50℃（至適温度）における活性値を100として、各温度における活性値を相対値で示したグラフである。

図8は、実施例において、糖化率の異なるHSA（ヒト血清アルブミン）に対するFAOD反応に基づく吸光度の測定結果を示すグラフである。

#### 10 発明を実施するための最良の形態

以下、必要に応じて図面を参照しつつ、本発明を詳細に説明する。

##### （試料）

本発明の測定方法においては、糖化タンパク質を含有する任意の試料（典型的には、生体由来の試料）を用いることができる。このような試料としては、  
15 例えば、血液（全血、血漿または血清）、尿等の生体由来の試料を挙げることができる。

上記試料の後述するプロテアーゼによる処理は、通常は、それぞれの酵素の供給者の指示に従って行えば良い。例えば、前記プロテアーゼが後述するスミチームMP（商品名、新日本化学工業株式会社製）の場合には50℃で、プロ  
20 テアーゼXIV（商品名、シグマ社製）の場合には37℃で、いずれもトリス-HCl緩衝液（pH8.0）中で、約30分間インキュベートすることが好ましい。

##### （プロテアーゼ）

好適な検出感度を得る点からは、本発明において試料中の糖化タンパク質を  
25 消化・断片化するプロテアーゼは、使用するFAODに応じて選択することが好ましい。

前記プロテアーゼとしては、1種類のプロテアーゼを用いてもよく、また複数種類のプロテアーゼを組み合わせ、ないしは混合して用いてもよい。この際、必要に応じて、複数種類のプロテアーゼを用いて、より特異的に糖化アミノ酸の断片化処理が行われるようにして、検出感度を向上させることも可能である。

本発明においては、正確な糖化タンパク質測定を行うことが容易な点からは、プロテアーゼ XIV（商品名、シグマ社製）またはアスベルギルス属由来のプロテアーゼを用いることが好ましい。前記アスベルギルス属由来のプロテアーゼとしては、特にアスベルギルス メレウス (*Aspergillus melleus*; 以下「*A. melleus*」という) 由来のプロテアーゼを用いることが好ましい。

このような *A. melleus* 由来のプロテアーゼの好適な例として、特定の *A. melleus* 株（寄託機関の名称・あて名：〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所、寄託日：1998年3月3日、寄託番号：FERM BP-6277）から産生されるプロテアーゼであって、後述する市販品たる「スミチームMP」と同等の酵素特性（同程度のFAODとのマッチング性、ないしは同程度の活性；後述する実施例4を参照）を示すプロテアーゼであることが検討の上確認された。

上記した *A. melleus* 由来のプロテアーゼには、その至適pHが塩基性側のものと、酸性側のものがあるが、そのいずれも本発明に使用することができる。

同様に、本発明において好適に使用可能な *A. melleus* 由来のプロテアーゼとして、食品加工の分野で用いられているスミチームMP（商品名、新日本化学工業株式会社製）を挙げることができる。このスミチームMPは、食品酵素として用いられており、安価でしかも大量供給が可能であることから、スクリーニング等の臨床検査への適用上、有利に使用可能である。

一般に、糖化タンパク質は、タンパク質の種類によって、詳しくはタンパク質を構成するアミノ酸の種類と位置によって糖化される部位が決まっている。

前記タンパク質がアルブミンの場合、最も糖化され易いのは、N末端から525番目のリジンであり、糖化アルブミンの大部分では、このN末端から525番目のリジン部位が糖化されている。したがって、この糖化リジンを好適に断片化処理するプロテアーゼを用いることができれば、検出感度を向上させることができる。上記した「プロテアーゼ XIV」ないし *A.melleus* 等のアスペルギルス属由来のプロテアーゼ（「スミチームMP」等）は、この点からも好適に使用可能である。

更に、本発明においては、プロテアーゼ処理した後に、簡単な処理によって不活性化することが容易なプロテアーゼを使用することが好ましい。このような「簡単な処理」の例としては、例えば、pH変化、加熱、インヒビター添加等が挙げられる。

（至適pHが酸性側のプロテアーゼ）

本発明においては、糖化タンパク質の糖化部位における糖化アミノ酸を効率良く切り出すことができ、FAODによって、消費する酸素または反応生成物（例えば、過酸化水素）の絶対量を増加させて、検出感度の向上を可能とするプロテアーゼであれば、酸性側（pH7未満）に至適pHが存在するプロテアーゼを用いても良い。

このような至適pHが酸性側のプロテアーゼを用いた場合、糖化タンパク質の断片化処理後に行うプロテアーゼの不活性化は、FAODの至適pH（塩基性側、例えばpH=8）に調整することのみで行うことができるため、プロテアーゼ不活性化の後、FAOD反応の操作が非常に簡便となり、日つ迅速処理が可能となる。pHを変える方法では、熱変性やインヒビターを添加して、プロテアーゼを不活性化する操作は不要となる。

このような至適pHが酸性側のプロテアーゼとしては、例えば、前記 *A.melleus* が生産するプロテアーゼから分離生成される、至適pHが酸性側のプロテアーゼが使用可能である。

(プロテアーゼの不活性化)

本発明の糖化タンパク質測定においては、例えば、プロテアーゼによる糖化タンパク質の断片化処理の後に、プロテアーゼを不活性化させ、F A O Dを添加することによりF A O D反応を開始させることができる。このようなプロテ

5    アーゼ不活性化を行うことにより、F A O Dの前記プロテアーゼ断片化処理を抑制ないし防止することが好ましい。

(F A O D)

本発明においては、生体成分との関係（例えば、タンパク質を構成するアミノ酸の種類と位置）によって糖化される部位が決まるため、測定対象たる糖化

10    タンパク質の種類に応じて、最適なF A O Dを選択することが好ましい。

本発明方法に使用可能なF A O Dとしては、フサリウム属(*Fusarium*)、ジベレラ属(*Gibberella*)、ペニシリウム属(*Penicillium*)、アスペルギルス属(*Aspergillus*)等に属する菌を、フルクトシルリジン及び/またはフルクトシルN $\alpha$ - $\gamma$ -リジンの存在下で培養することにより誘導される酵素を挙げることが

15    できる。このようなF A O Dは、例えば、特開平7-289253号公報、特開平8-154672号公報、特開平8-336386号公報等に記載された方法で得ることができる。

本発明においては、中でも、(ヒト血清ないしヒト糖化アルブミンの糖化しやすい部位であるところの)フルクトシルリジン及び/またはフルクトシルポリ

20    リジンに対して活性を有する点からは、上記のフサリウム・オキスピズモムS-1F4 (*Fusarium oxysporum* S-1F4)由来のF A O D-S、及びジベレラ・フジクロイAKU 3802 (*Gibberella fujikuroi*)由来のF A O D-G (特開平7-289253号公報)が特に好適に使用可能である。

(F A O Dの力価)

本発明に用いるF A O Dの力価は、以下の方法で好適に測定可能である。

(1) 生成する過酸化水素を比色法により測定する方法

### A. 速度法

100 mM フルクトシル N $\alpha$ -Z-リジン (FZL) - 45 mM 4-アミノアンチピリン - 60 ユニット/ml パーオキシダーゼ溶液、及び 60 mM フェノール溶液、それぞれ 100  $\mu$ l と、0.1 M トリス-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 1 ml と、(力価を測定すべき FAOD の) 酵素溶液 50  $\mu$ l とを混合し、全量を蒸留水で 3.0 ml とする。

得られた溶液を 30°C で 2 分間 インキュベートした後、100 mM フルクトシル N $\alpha$ -Z-リジン (FZL) 溶液 50  $\mu$ l を添加し、505 nm における吸光度を経時的に測定する。この反応により生成するキノン色素の分子吸光係数 ( $5.16 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) から、1 分間に生成する過酸化水素のマイクロモルを算出し、この数字を酵素活性単位 (ユニット:U) とする。

### B. 終末法

上記 A 法と同様に処理し、基質 (FZL) を添加し、30 分間 30°C でインキュベートした後の 505 nm における吸光度を測定し、予め作成された検量線に基づいて酵素活性を求める。

#### (2) 酵素反応による酸素吸収を測定する方法

0.1 M トリス-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 1 ml と酵素溶液 50  $\mu$ l を混合し、蒸留水で全量を 3.0 ml とし、ランク ブラザーズ社の酸素電極のセルに入れる。

前記セル内の溶液を 30°C で攪拌し、溶存酸素と温度を平衡化した後、50 mM FZL 100  $\mu$ l を添加し、酸素吸収を記録計で連続的に計測し、初速度を得る。標準曲線から 1 分間に吸収された酸素量を求め、これを酵素単位とする。

#### (糖化タンパク質の測定方法)

本発明の糖化タンパク質測定方法においては、上述したプロテアーゼを用いて試料中の糖化タンパク質を FAOD が反応しやすい状態に処理しながら、ま

たはプロテアーゼにより処理した後に、F A O D を作用させ、前記 F A O D - 基質反応における酸素の消費量または反応生成物の量を測定することが好ましい。

糖化タンパク質（ないしそのプロテアーゼ処理生成物）と F A O D との反応によって、過酸化水素及びグルコソンが生成される。これらの過酸化水素及びグルコソンのいずれも、後の工程で測定対象となる F A O D 反応生成物として使用可能である。これらの F A O D 反応生成物の測定方法は特に制限されず、公知の方法から適宜選択して使用することができ。

上記の過酸化水素の量は、前記技術分野で既知の方法、例えば、比色ないし発色法（ペルオキシダーゼまたはペルオキシダーゼ様活性を有する触媒による分解に伴って色素を生成する色原体を用いて測定する方法、等）、電気化学的手法によって測定する方法（過酸化水素電極を用いる方法、等）、カタラーゼとアルコールの存在下で（過酸化水素により）生成されたアルデヒドの量を測定する方法等のいずれによっても、過酸化水素の発生量を定量することができる。

本発明においては、例えば、上記方法を用い、且つ既知量の糖化タンパク質を含有する試料を用いて予め作成された検量線に基づいて、糖化タンパク質を定量すればよい。ただし、F A O D の活性量は、常に一定であることが好ましい。必要に応じ、生体成分等からなる試料を緩衝液により希釈した後に測定に供することが好ましい。

#### （発色系）

過酸化水素の比色法における発色系としては、ペルオキシダーゼの存在下で 4-アミノアンチピリン（4 A A）、3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン（M B T H）等のカップラーとフェノール等の色原体との酸化縮合により色素を生成する系を用いることができる。

色原体として、フェノール誘導体、アニリン誘導体、トルイジン誘導体等が

使用可能である。色原体の具体例としては、例えば、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジン、N,N-ジメチルアニリン、N,N-ジエチルアニリン、2,4-ジクロロフェノール、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3,5-ジメチルアニリン(MAPS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメチルアニリン(MAOS)等が挙げられる。

また、ペルオキシダーゼの存在下で酸化されて呈色する公知のロイコ型発色試薬も、上記の色原体として用いることができる。このような発色試薬の具体例としては、o-ジアニシジン、o-トリジン、3,3-ジアミノベンジジン、3,3,5,5-テトラメチルベンジジン、N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4-ビス(ジメチルアミノ)ビフェニルアミン(DA64)、10-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-3,7-ビス(ジメチルアミノ)フェノチアシン(DA67)、等が挙げられる。

(その他の測定法)

色原体を用いる過酸化水素の測定には、上記した比色法のほか、蛍光法、化学発光法も使用可能である。

蛍光法には、酸化によって蛍光を発する化合物、例えば、ホモバニリン酸、4-ヒドロキシフェニル酢酸、チラミン、パラクレゾール、ジアセチルアセトレスシン誘導体等を用いることができる。化学発光法には、触媒としてペルオキシダーゼ、フェリシアン化カリウム、ヘミン等を、基質としてルミノール、ルシゲニン、イソルミノール、ピロガロール等を用いることができる。

更に、前述した過酸化水素の測定には、アルコール(例、メタノール)の存在下でカマナーゼを作用させ、生成するアルデヒドをハンチ反応や、上記したMBTHとの縮合反応により発色させる系も利用できる。このアルデヒドをアルデヒドデヒドロゲナーゼと共役させ、NAD(NADH)の変化を測定する



こともできる。

また、過酸化水素以外のF A O D反応生成物たるグルコソンの測定には、ジフェニルアミン等の公知のアルドース試薬を用いることができる。

(電極測定)

5 F A O D生成物たる過酸化水素を電極を用いて測定する場合、電極には、過酸化水素との間で電子を授受することのできる材料である限り特に制限されないが、例えば白金、金、銀等が好適に使用可能である。前記電極測定は、アンパロメトリー、ポテンシヨメトリー、クーロメトリー等、当業者既知の方法で行うことができる。

10 また、F A O Dまたは基質と電極との間の反応に電子伝達体を介在させ、得られる酸化、還元電流あるいはその電気量を測定することによっても、糖化タンパク質を測定できる。前記電子伝達体としては、電子伝達機能を有する任意の物質が使用可能であり、例えば、フェロセン誘導体、キノン誘導体等の当業者に既知の物質が挙げられる。

15 更に、F A O D反応により生成する過酸化水素と電極との間に電子伝達体を介在させ、得られる酸化、還元電流あるいはその電気量を測定することによっても、糖化タンパク質を測定できる。

#### 実施例

20 以下に実施例を挙げて本発明を更に詳しく説明する。

#### 実施例 1

(プロテアーゼの1次スクリーニング)

25 プロテアーゼの1次スクリーニングとして、糖化タンパク質を各プロテアーゼで断片化処理した後、F A O DとしてF A O D-Gを反応させ、生成する過酸化水素量を測定した。

(1) 材料

被検酵素：後述する（表１）記載のプロテアーゼ

基質：ヒト血清アルブミン（商品名：A l b、S I G M A社製）

ヒト血清（serum, Bio Whittaker）

FAOD：FAOD-G（ギベレラ・フジクロイ(Gibberella fujikuroi)から特開平 7-289253 号に記載された方法により分離精製した FAOD-G）

色原体：4-アミノアンチピリン

N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-  
-m-トルイジン

緩衝液：0.1 M トリス-HCl 緩衝液 (pH 8.0)

## (2) プロテアーゼ処理

上記した 0.1 M トリス-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を用いて 5% (濃度) に調製したヒト血清アルブミンまたはヒト血清を 500  $\mu$ l と、各プロテアーゼの至適 pH を示す緩衝液を用いて 10 U/ml に調整した各プロテアーゼ 500  $\mu$ l とを混合し、それぞれの至適温度で 30 分間インキュベートした後、約 90°C で 5 分間加熱してプロテアーゼ反応を停止させた。

## (3) FAOD 反応

以下の組成を有する「FAOD 反応液」を調製した。

上記 (2) で得たプロテアーゼ処理液の上清 400  $\mu$ l

3 U/ml の FAOD-G 10  $\mu$ l

3 mM 4-アミノアンチピリン溶液 30  $\mu$ l

3 mM N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-  
m-トルイジン溶液 20  $\mu$ l

60 U/ml パルオキシノーゼ溶液 50  $\mu$ l

0.1 M トリス-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 500  $\mu$ l

上記組成を有するF A O D反応液を37℃で30分間インキュベートした後、555nmにおける吸光度を測定した。各サンプルについてブランク「F A O Dを含有しない対照溶液に基づく吸光度」を測定し、上記により得たサンプルの吸光度から、前記ブランクの吸光度を差し引いて、実際の測定値とした。

- 5 以上の手順に従って、各種プロテアーゼ処理物とF A O D反応により生成する過酸化水素量を吸光度によって得た結果から、有用性を判断するために、各測定値はプロテアーゼX I V処理で得られた吸光度を基準値（100%）として、相対活性値として求めた。

上記測定により得られた結果を、下記の表1および表2にまとめて示す。

10

〔表 1〕

## 中温域プロテアーゼ

温度	プロテアーゼ	相対活性 (%) Alb serum
25°C	1 アミノペプチダーゼ	10 34
	2 アミノペプチダーゼ I	6 21
	3 カルボキシペプチダーゼ B	59
	4 カルボキシペプチダーゼ Y	2 115
	5 カテプシン B (bovine)	44
	6 ロイシンアミノペプチダーゼ (cytosol)	56 42
	7 パパイン	21
	8 プロテイナーゼ A	9 6
	9 トリプシン	5 5
	10 TPCKトリプシン	5 5
	11 キモトリプシン	6
30°C	12 リジルエンドペプチダーゼ	4 11
	13 スブチリシン A	13 47
	14 プロテアーゼ (type XX I)	9 7
	15 アクロモペプチダーゼ	21
37°C	16 ロイシンアミノペプチダーゼ	8 25
	17 プロナーゼ E	99 58
	18 プロテアーゼ	86 39
	19 プロテアーゼ (type XIV)	100 100
	20 プロテアーゼ (type XVII)	24
	21 プロテイナーゼ K	5 91

〔表 2〕

## 高温域プロテアーゼ

温度	プロテアーゼ	相対活性 (%)		
		Alb	serum	
50°C	プロテアーゼ (type XIV)	100	100	
	22 ヒト肝臓カテプシン B			
	23 プロナーゼ	65	86	
	24 プロテアーゼ A	90		
	25 プロテアーゼ M	12		
	26 プロテアーゼ N	22	50	
	27 プロテアーゼ P	51	74	
	28 パパイン W-40	11	34	
	29 スミチールム LP50	17	32	
	30 スミチールム LPL		26	
	31 スミチールム MP	150	136	
	32 スミチールム FP		18	
	33 プロチン PC10	25		
60°C	34 ペニシプロロテイナーゼ			
	35 プロテアーゼ S	138	74	
	36 プロチン A	37	91	
	37 プロチン FA	39	185	
	38 サモアーゼ	99	20	
	39 プロメライン F	35	69	
	40 プロレザン G	32	44	
	41 スミチールム AP	39	122	

この1次スクリーニングの結果（表1および2）に基づき、ヒト血清アルブ  
ミン（HSA）およびヒト血清の両基質で高い吸光度が得られたプロテアーゼ  
5      を中心、10種類のプロテアーゼを選択した。

## 実施例2

（プロテアーゼの2次スクリーニング）

本実施例では、FAODとして前述したFAOD-SおよびFAOD-Gの  
両酵素について、実施例1で選択された10種類のプロテアーゼについて2次  
10      スクリーニングを実施した。FAOD-Sは、特開平7-289253号公報に  
記載された方法により分離精製した酵素を用いた。

この2次スクリーニングでは、1回の測定に使用したFAOD-S量を0.  
06U（6U/ml、10 $\mu$ l）として用いた以外は、実施例1と同様の測定  
を行った。

15      上記2次スクリーニングにより得られた結果を、下記表3に示す。

〔表 3〕

	Alb	FAOD活性値( $\Delta$ OD555)			
		S	G	S	G
プロテアーゼ					
プロテアーゼ XIV	0.1350	0.1100	0.0570	0.0428	
ロイシンアミノペプチダーゼ	0.0037	0.0025	0.0011	0.0191	
トリプシン	0.0064	0.0143	0.0065	0.0008	
プロテアーゼ	0.0962	0.0756	0.0481	0.0318	
プロテアーゼ	0.1273	0.0940	0.0520	0.0274	
プロテイナーゼ K	0.0493	0.0501	0.0217	0.0216	
プロテアーゼ S	0.0681	0.0210	0.0161	0.0135	
スミチーム AP	0.0110	ND	ND	ND	
スミチーム MP	0.1477	0.1205	0.0553	0.0464	
プロチン FA	0.0170	ND	0.0284	0.0725	

上記表 3 に示したように、各プロテアーゼに対する F A O D - S および F A O D - G の両酵素が同様な傾向を示すことが判明した。よって、F A O D を用いる糖化アルブミン測定に最適なプロテアーゼとして、ヒト血清アルブミン (H S A) およびヒト血清の両基質で高い測定値が得られたスミチーム MP、およびプロテアーゼ X I V を選定した。

### 実施例 3

(スミチーム MP と F A O D - G 又は F A O D - S を用いる糖化アルブミンの測定)

ヒト血清アルブミンを 0、5、10、15、20、25 および 30 mg / m l の濃度になるように、緩衝液を用いて希釈して測定用試料を調製し、実施例 2 のスクリーニングと同様の方法で、スミチーム MP による消化・断片化後に F A O D - G 又は F A O D - S を作用させた際に生成する過酸化水素量を、吸光度として測定した結果を図 1 のグラフに示す。

図 1 中の縦軸は 555 nm における吸光度を示し、横軸はアルブミンの濃度を示す。この図 1 に示した結果から、プロテアーゼとしてスミチーム MP を用いた際には、F A O D の上記試料に対する作用に基づく発色が、糖化アルブミン濃度に良好な比例関係を示し、したがってスミチーム MP は、糖化ヒトアルブミンを測定するために有用なプロテアーゼであることが確認できた。

### 実施例 4

(A.melleus の生産する塩基性側に至適 pH があるプロテアーゼの諸検討)

A.melleus 菌株 (寄託番号 F E R M B P - 6 2 7 7)、および I F O (財団法人発酵研究所) から分譲を受けた下記菌株の合計 5 株の A.melleus について、検討を行った。

A.melleus (寄託番号 F E R M B P - 6 2 7 7)

A.melleus I F O 4 3 3 9



A.melleus I F O 4 4 2 0

A.melleus I F O 7 5 4 1

A.melleus I F O 3 2 0 3 5

(菌株の復元および培養)

- 5 入手した上記の菌株5株は凍結乾燥状態のアンプルであったため、下記の組成を有する指定の復元水200 $\mu$ lで復元した後、下記の組成を有するGPYMスラント接種した。30℃で2日間の培養を行ったところ、全ての株で生育が見られた。このスラントを4℃で保存し、培養を行う際にはこのスラントからそれぞれの培地へ植え継ぎを行った。

10 <復元水の組成>

Polypepton	0.5%
Yeast extract	0.3%
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.1%

- 15 (上記組成を有する混合物をpH7に調整した後、オートクレイブ(120℃、20分)処理した。)

<GPYMスラントの組成>

Glucose	1.0%
Pepton	0.5%
20 Yeast extract	0.3%
Malt extract	0.3%
Agar	2.0%

- 25 (上記したAgar以外の成分を蒸留水に溶解し、pH5.5~6に調整・メスアップ(秤量)した後、Agarを加え電子レンジで前記Agarを溶かした。得られた組成物を試験管に8mlずつ分注した後、オートクレイブ処理(120℃、20分)した。その後、前記試験管を斜めにして固めた。)

次に、各菌株を下記組成のG P Y M培地10 m lに接種し、30℃で2日間振とう培養した後、同培養液500 m lに植え継ぎ、さらに2日間の培養を行った。振とうの速度は、共に111 r p mとした。

<G P Y M培地の組成>

5	G l u c o s e	1.0%
	P e p t o n	0.5%
	Y e a s t e x t r a c t	0.3%
	M a l t e x t r a c t	0.3%

(上記成分を蒸留水に溶解し、p H 5.5～6に調整した後、オートクレイブ  
10 処理(120℃、20分)した。)

培養の結果、全ての菌株で良好な生育が見られた。次いで、濾過により菌体を集菌して重量(湿重量)の測定を行った。結果を下記に示す。

<A.melleus の菌体量(湿重量)>

	A.melleus	F E R M B P - 6 2 7 7	20.6 g
15	A.melleus	I F O 4 3 3 9	20.7 g
	A.melleus	I F O 4 4 2 0	11.1 g
	A.melleus	I F O 7 5 4 1	8.5 g
	A.melleus	I F O 3 2 0 3 5	16.3 g

20 スミチームMP様のプロテアーゼは菌体外酵素であることが予想されたため、培養液上清を以下の検討に用いることとした。集菌した菌体は-20℃で保存した。

(培養液上清の部分精製)

25 上記で得た菌体集菌後の培養液上清100 m lを硫酸沈殿により粗部・部分精製した。スクリーニングの目的であるスミチームMPが中性付近で安定であること、培養終了時のp Hが4.6～5付近であったことから、硫酸沈殿の際

にはpH 6～6.5を維持した。硫安の添加は水冷下で行い、硫安添加終了後4℃、1時間の攪拌を行った。攪拌終了後、4℃、10000rpm、40分の遠心処理を行い沈殿物を回収した後、最少量の蒸留水に溶解し、4℃にて一夜透析を行った。透析の外液は蒸留水とした。

- 5 透析終了後、透析の内液をマイクロチューブにて遠心し（4℃、12000rpm、20分）上清を回収し、その体積を測定した。得られた結果を下記に示す。

<培養液上清のpH及び硫安添加終了時のpH>

	A.melleus	FERM BP-6277	pH 4.8 → pH 6.264
10	A.melleus	IFO 4339	pH 5 → pH 6.4
	A.melleus	IFO 4420	pH 5.068 → pH 6.008
	A.melleus	IFO 7541	pH 4.650 → pH 6.030
	A.melleus	IFO 32035	pH 4.967 → pH 6.000

<透析終了後の培養上清濃縮液の容量>

15	A.melleus	FERM BP-6277	1.8ml
	A.melleus	IFO 4339	3ml
	A.melleus	IFO 4420	2ml
	A.melleus	IFO 7541	3.8ml
	A.melleus	IFO 32035	2.2ml

- 20 上記に示したように、透析終了後の培養上清濃縮液の容量は1.6～3.8mlであり、硫安添加前の体積100mlと比較すると、数十倍の濃縮率であったこととなる。

（プロテアーゼ活性の測定）

- 25 上記で得た各培養上清濃縮液（5種類）のプロテアーゼ活性を測定した。このプロテアーゼ活性測定に際しては、上記の培養上清濃縮液20μlと、基質たる5重量% HSA（pH 8）20μlと、0.1M トリス-HCl緩衝液（

pH 8.0) 60  $\mu$ l との混合物を 37°C、30 分間反応させた後、100  $\mu$ l の 0.6 M トリクロロ酢酸 (TCA) を加えて氷冷下で 15 分以上放置した後、4°C、12000 rpm 10 分間の遠心処理にてタンパク質を分離した (TCA 沈殿)。

- 5 前記 TCA 沈殿により得られた上清 25  $\mu$ l に、Bio-Rad DC Protein assay kit (Bio-Rad 社製) の Reagent-A 125  $\mu$ l と、Reagent-B 1000  $\mu$ l とを加え、室温で 15 分間放置した後、750 nm の吸光度を測定することにより、上記上清中の遊離アミノ酸を測定した。この遊離アミノ酸測定の際、培養液中に元々存在していたアミノ酸がプロテアーゼ活性としてカウントされることを避けるため、プロテアーゼ反応の時間 0 分のものを同様に処理して、
- 10 ブランク試料とした。

上記測定の結果、5 種類の培養上清濃縮液全てにおいて、30 分の反応により明確な発色が認められ、プロテアーゼ活性の存在が確認された。

- また、1 mg/ml (260 U/ml) に調整したスミチーム MP が切り出す
- 15 遊離アミノ酸量と比較することにより、HSA に対するおおよその活性値を算出した。得られた結果を下記に示す。

<プロテアーゼ活性値 (スミチーム MP 1 mg/ml、260 U/ml と比較)>

20

A.melleus	FERM BP-6277	0.2087 mg/ml	54.5 U/ml
A.melleus	IFO 4339	0.1252 mg/ml	32.5 U/ml
A.melleus	IFO 4420	0.5144 mg/ml	113.5 U/ml
A.melleus	IFO 7541	0.0953 mg/ml	25.0 U/ml
A.melleus	IFO 52055	0.3298 mg/ml	85.5 U/ml

25

(プロテアーゼの至適 pH の測定)

至適pHの測定にあたっては、上記「プロテアーゼ活性測定」で用いた活性測定用の反応液を構成する緩衝液のpHを変更することにより測定した。

0.1M Tris-HCl緩衝液でカバーすることが不可能なpH領域については0.1M リン酸カリウム緩衝液及び0.1M グリシン-NaOH緩衝液を使用した。反応の温度は37℃とした。pH4~13についてのプロテアーゼ活性を測定することとし、pH7~10については0.5きざみで、それ以外の領域は1.0きざみで測定を行った。

この結果、5種類の酵素のいずれについても、スミチームMPとほぼ同様のpH8~9に至適pHが確認された。A.melleus FERM BP-6277由来のプロテアーゼの活性のpH依存性を図2のグラフに示す。このグラフにおいては、酵素活性を、至適pHにおける活性（前記活性値を100に換算）を基準とした相対活性値で示した。

また、それに加えて酸性側にも活性のピークが見られた。この「酸性プロテアーゼ」の活性は、弱アルカリ性プロテアーゼと同等かそれ以上であった。これらのプロテアーゼは菌体外酵素であり、培地のpHにおいて最も活性の高いものが大量に分泌されているとすると、培養終了時のpHが酸性側に大きく傾いていたことから、この状況は充分に起こり得ると推定された。

A.melleus 由来の酸性プロテアーゼについても、以降の実施例において、諸性質の確認を別途行うこととした。

#### （プロテアーゼの至適温度の測定）

至適温度の測定においては、緩衝液のpHを8.5に固定し、15~70℃の範囲において5℃きざみで測定を行った。活性測定は、30分の消化反応の後、プロテアーゼ活性測定と同様の方法で行った。

上記測定の結果、5種類の酵素とも40℃または50℃に至適温度が存在することが判明した。A.melleus FERM BP-6277由来のプロテアーゼの活性の温度依存性を図3のグラフに示す。このグラフにおいては、酵素活性

を、至適温度における活性（前記活性値を100に換算）を基準とした相対活性値で示した。上記した特性は「スミチームMP」（45～50℃で実用的に作用し、50℃を至適温度とする）に非常に類似しているといえる。

5 (A.melleus FERM BP-6277由来プロテアーゼの分子量の推定)

次に合成バプチドに対する活性が「スミチームMP」に類似していたA.melleus FERM BP-6277由来のプロテアーゼについて、GPC（ゲル濾過クロマトグラフィー）を行った。カラムはSuperdex 200 pg 16/60を使用し、30秒毎にフラクションを回収した。GPCの条件は、回収した  
10 フラクションのプロテアーゼ活性を測定することにより、そのフラクションの溶出時間からプロテアーゼの分子量を推定した。

<GPCの条件>

カラム: Supordex 200 pg 16/60 (ファルマシア社)  
溶出液: 20mM トリス-HCl 緩衝液  
15 流速: 0.5ml/min  
温度: 室温  
検出器: UV (220nm)  
注入量: 50μl

20 プロテアーゼ活性の測定に際しては、GPCの過程でのプロテアーゼの希釈等を考慮して、5重量% HSA 20μlに各フラクション80μlを加え、37℃で一晩 (overnight) の反応を行った。TCAの添加以降の操作は、上記「プロテアーゼ活性測定」時の手順に従った。

この結果、GPCにより得られた各フラクションのうち、フラクション番号、  
25 41～43で高い活性が見られ、したがってこの菌株由来のプロテアーゼの分子量は18382～22130であることが推察された。

(スミチームMPを用いたHSAの糖化率の測定)

次にHSAの糖化率測定を試みた。先ず「スミチームMP」による糖化率測定を行った。HSA (SIGMA社, Alubumin Human Fraction V) は糖化率 11.7、22.5、26.0%のもの(糖化率は、株式会社京都第一科学社製のKDK GAA-2000 (HPLC法)で測定した)を5%になるように溶解した(pH8)。また、11.7%のHSAを、他の2つのものとそれぞれ等量ずつ混合することにより便宜上17.1%、18.85%のものも準備した。

反応は、5重量% HSA 200  $\mu$ l に0.1M トリス-HCl 緩衝液 100  $\mu$ l とスミチームMP (10 mg/ml) 100  $\mu$ l を加えて37°Cで4時間プロテアーゼ反応を行った後、FAOD-S (0.5602 U/ml) を用い、下記4AA-TOOS発色系で活性を確認した。

<FAOD反応液の組成>

プロテアーゼ反応後の溶液	400 $\mu$ l
0.1M トリス-HCl 緩衝液 (pH8.0)	110 $\mu$ l
3mM 4-アミノアンチピリン	30 $\mu$ l
3mM TOOS	30 $\mu$ l
60 U/ml POD	30 $\mu$ l
0.5602 U/ml FAOD-S	100 $\mu$ l

上記測定の結果、図4のグラフに示すように、上記した「スミチームMP」/FAOD-S測定系を用いた場合には、HSAの糖化率の上昇と共に、発色量も増加することが確認された。また、糖化率と吸光度との間に正の相関が得られ、この測定系を用いる方法がHSAの糖化率測定に有効であることが判明した。

(A.melleus FERM BP-6277由来プロテアーゼを用いたHSAの糖

化率の測定)

次に、上記したGPCにも使用した *A.melleus* FERM BP-6277 由来のプロテアーゼについて、上記「スミチームMP」を用いた場合と同様の方法でHSAの糖化率の測定の実験を行った。ただし、プロテアーゼ活性が低いことが判明していたため、5重量% HSA 200  $\mu$ l に対してプロテアーゼ溶液 200  $\mu$ l を加えて反応を行うこととし、反応時間は5時間とした。

「スミチームMP」を用いた場合と同様に、FAOD-Sで発色を確認したところ、図5のグラフに示すように、スミチームMPの検討と同様に正の相関が得られた。したがって、HSAの糖化率の測定に対して、「スミチームMP」と同様に、上記の *A.melleus* FERM BP-6277 由来プロテアーゼを用いることが有用であることが判明した。

図5のグラフは原点を通過していないが、本発明者らの知見によれば、これはプロテアーゼ及びFAOD-S中の不純物やHSA中の成分が反応して擬発色しているものと推定された。酵素の精製度が向上すれば、グラフは原点に近づくものと推定される。

#### 実施例 5

(至適pHが酸性側のプロテアーゼの分離)

本実施例において *A.melleus* としては、株式会社京都第一科学が保存する菌株 *A.melleus* KDK3001 (FERM BP-6277)、および財団法人発酵研究所 (IFO) から入手した *A.melleus* 4株 (*A.melleus* IFO4339、*A.melleus* IFO4220、*A.melleus* IFO7541、および *A.melleus* IFO32035) を使用した。

上記のIFOから入手した菌株4株は凍結乾燥状態のアンプルであったため、分譲元が指定する復元水を作成し、同復元水 200  $\mu$ l で復元した後、GPYMSラントに接種を行った。30℃で2日間の培養を行ったところ、全ての株



で生育が見られた。ここで用いたGPYMスラントは、下記に示す組成とした。

	Glucose	1.0%
	Pepton	0.5%
	Yeast extract	0.3%
5	Malt extract	0.3%
	Agar	2.0%

(pH 5.5~6.0、120℃・20minオートクレイブにて滅菌)

次に各菌株（合計5種類）を10mlのGPYM培地に接種し、30℃で2日間振とう培養した後、同培養液500mlに植え継ぎ、さらに2日間の培養を行った。これらの振とうの速度は共に111rpmとした。

上記の培養の結果、全ての菌株で良好な生育が見られた。濾過により菌体を集菌して重量（湿重量）の測定を行った。目的とするプロテアーゼは菌体外酵素であることが予想されるため、上記の操作で得られた培養液上清を、以降の検討に用いた。ここで用いたGPYM培地は、下記に示す組成とした。

15	Glucose	1.0%
	Pepton	0.5%
	Yeast extract	0.3%
	Malt extract	0.3%

(pH 5.5~6.0、120℃・20minオートクレイブにて滅菌)

20 菌体集菌後の培養液上清100mlを、硫酸沈殿法により濃縮・部分精製した。A.melleus から分離精製された食品用酵素であるスミチームMP（市販品）が中性付近で安定であること、及び培養終了時の上清pHが4.6~5付近であったことから、硫酸沈殿の際にはpH 6~6.5を維持した。

25 上記の硫酸沈殿における硫酸の添加は氷冷下で行い、硫酸添加終了後4℃、1時間の攪拌を行った。攪拌終了後、4℃、10000rpm、40分の遠心を行い、沈殿物を回収した後、最少量の蒸留水に溶解し、4℃にて一夜、蒸留

水で透析（半透膜：透析膜、三光純薬社製）を行った。透析終了後、透析の内液をマイクロチューブ（遠心用）にて遠心し（4℃、12000rpm、20分）上清を回収した。

各培養上清濃縮液のプロテアーゼ活性を測定した。上記した「スミチームM P」は至適pHを8付近に持つ弱アルカリ性プロテアーゼであるが、本発明者らの実験に基づき、前記弱アルカリ性プロテアーゼ以外に、酸性側に至適pHのあるプロテアーゼの存在が予測されたため、酸性プロテアーゼの活性測定を確認した。

このプロテアーゼ活性測定時の基質としては5重量% HSA（pH5）を用い、上記で得られた培養上清濃縮液20 $\mu$ lと、5重量% HSA 20 $\mu$ l及び0.1M トリス-HCl 緩衝液（pH5）60 $\mu$ lを混合し、37℃、30分間の反応を行った。次に0.6M トリクロロ酢酸（TCA）を100 $\mu$ l加えて氷冷下にて15分間以上放置し、4℃、12000rpm 10分間の遠心分離（TCA沈殿）を行った。このTCA沈殿によりタンパク質を除去した後得られた上清25 $\mu$ lを用いて、前記上清中の遊離アミノ酸量を、市販のBio-Rad DC Protein assay kit（Bio-Rad社製）を用いて測定した（前記キットの使用方法については、供給者の指示に従った）。また、この遊離アミノ酸量測定に際しては、培養上清濃縮液中に含まれている遊離アミノ酸の影響を回避するため、上記3液を混合した直後にTCA沈殿を行うことにより得たサンプルをブランクとして用いた。

その結果、上記した5種類の菌株にそれぞれ対応する5種類の培養上清濃縮液全てにおいて、30分間の反応により明らかな発色が認められ、プロテアーゼ活性の存在が確認された。このプロテアーゼ活性の確認に基づき、これ以降の検討には、この培養上清濃縮液を部分希釈した溶液を、プロテアーゼ含有溶液として用いた。

次に、上記した5種類の菌株のうち、A.melleus KDK3001由来のプロ

テアーゼ含有溶液の至適pHについて測定を行った。

至適pHの測定は、まず基質溶液として、0.1M トリス-HCl緩衝液を用いて、pHが1.6及び8に調整した5重量% HSA溶液を作製し、これらの2液を混合してpH1.6～6.8の範囲内で基質溶液（合計10種類）  
5   を作製した。更にpH1.6のHSAに塩酸を添加し、pH1の基質溶液も作製した。

次に、上記した各pHに調整された基質溶液20 $\mu$ l、プロテアーゼ含有溶液20 $\mu$ l、蒸留水60 $\mu$ lとを加えて、37 $^{\circ}$ Cで30分間反応を行った。反応の直前（3液の混合直後）に反応溶液のpHを再度測定し、且つ、プロテ  
10   アーゼ反応時のpH（3液の混合直後）を再度測定したところ、pHは1.6～6.5の範囲内にあった。

酵素活性については、上記のプロテアーゼ酵素活性の測定時と同様に、TCA沈殿によりタンパク質を除去して、上清中の遊離アミノ酸量をBio-Rad DC Protein assay kitを用いて測定した。

その結果、A.melleus KDK3001由来の酸性プロテアーゼは、図6に示す通り、pH4.7～5.6の間に至適領域を有し、特にpH5において高い活性を示すプロテアーゼであることが確認できた。

上記 A.melleus KDK3001 由来の酸性プロテアーゼ至適温度の測定は、反応溶液のpHを5に固定し、15～70 $^{\circ}$ Cの範囲において5 $^{\circ}$ C間隔で測定を行  
20   った。30分間のインキュベーションの後、プロテアーゼの活性測定を上述した方法と同じ方法で行ったところ、図7に示す通り35～65 $^{\circ}$ Cで実用的に働き、40～50 $^{\circ}$ Cで高活性となり、この範囲に至適温度が存在することが判明した。また、最も高活性であったのは50 $^{\circ}$ Cの時であった。

プロテアーゼのおよその分子量を測定するため、A.melleus KDK3001  
25   由来の酸性プロテアーゼについてGPC（GPC）を行った。カラムはSuperdex 200 pg 16/60（ファルマシア社製）を使用し、30秒毎に

フラクションを回収した。GPCの条件は回収したフラクションのプロテアーゼ活性を測定することにより、そのフラクションの溶出時間からプロテアーゼの分子量を推定した。ここで用いたGPCの測定条件は、以下の通りであった。

<GPCの測定条件>

5	使用カラム	Superdex 200 pg 16/60 (ファルマシア社製)
	溶出液	20 mM トリス-HCl 緩衝液
	溶出条件	0.5 ml/min
	温度	室温
10	検出	UV検出 (220 nm)
	試料添加量	50 $\mu$ l

プロテアーゼ活性の測定は、GPCの過程での希釈を考慮し、5重量% HSAが20  $\mu$ lと各フラクション80  $\mu$ lを加え、37°Cで一昼夜インキュベーションを行い、プロテアーゼ活性を同様に測定した。前記GPCにより得られたフラクションのプロテアーゼ活性を前述と同様の測定方法により測定したところ、本菌由来のプロテアーゼの分子量は18382~22130であることが推察された。

#### 実施例 6

20 (酸性プロテアーゼを用いた糖化タンパク質の測定)

本実施例においては、実施例 5 により得られたプロテアーゼが酸性側に至適 pH があり、他方 FAOD の至適 pH が 8 である点を利用して、プロテアーゼ処理を行った後に FAOD の至適 pH (pH 8) に調整して (加熱やインヒビターの添加を必要となく) 前記プロテアーゼ活性を不活性化した。

25 A.melleus K1K3001 から分離精製したプロテアーゼ含有溶液を用いて、糖化率の異なる人血清アルブミン (HSA; SIGMA 社 ALBUMIN HUMAN

Fraction V およびBayer社 Albumin FrV)の測定を行った。これら H S Aの糖化率は、それぞれ11.7%、22.5%、および26.0%であった。これらの糖化率は、株式会社京都第一科学社製G A A-2000 (H P L C法)により予め測定を行って求めたものである。

5 以下の酵素法による糖化H S Aの測定においては、上記した各種の糖化H S Aを濃度5重量%、p H 5に調整して使用した。また、糖化率の異なるH S Aを混合して糖化率が17.1%、18.85%の試料も作製した。これら5つの糖化率のサンプルを使用して、実施例5で得たプロテアーゼ含有溶液を用いた糖化H S Aの測定を行った。

10 ただし、実施例5で得たプロテアーゼ活性は低いことが判明していたため、5重量%H S A 200  $\mu$  lに対して実施例5のプロテアーゼ含有溶液200  $\mu$  lを加えて反応を行うこととし、反応時間は5時間とした。このプロテアーゼ反応の後、F A O D (F A O D-S)を用いて発色を確認した。前記F A O Dとしては、特開平7-289253号に従って調製したF A O D-S (0.5602 U/ $\mu$  l)を使用した。

15 本実施例で用いたF A O Dの力価は、前述の速度法により測定した。前記力価測定に用いたF A O D発色系の反応液の組成は、以下の通りであった。

上記プロテアーゼ反応後の溶液	100 $\mu$ l
0.1M トリス-HCl緩衝液 (p H 8.0)	110 $\mu$ l
20 3 mM 4-Aminoantipyrine	30 $\mu$ l
3 mM T O O S	30 $\mu$ l
60 U/ $\mu$ l P O D (ペルオキシダーゼ)	30 $\mu$ l
0.5602 U/ $\mu$ l F A O D-S	100 $\mu$ l

25 上記組成を有するF A O D発色液を37°Cで30分間インキュベートした後、555 nmにおける吸光度を測定した。各サンプルについてブランク (基質を

含有しない対照溶液に基づく吸光度)をも測定し、上記により得たサンプルの吸光度から、前記ブランクの吸光度を差し引いて、実際の測定値とした。

上記測定の結果、図8のグラフに示すとおり、HSAの糖化率に応じてFAODによる発色反応が生じていた。したがって、本実施例で得た酸性プロテアーゼが、FAODとの組み合わせにおいて糖化タンパク質測定に充分に利用可能であることが確認された。

この図8のグラフは原点を通過していないが、これは、ここで用いたプロテアーゼないしFAOD中の不純物やHSA中の成分による発色であると推定された。したがって、酵素の精製度が上げることにより、グラフは原点に近づく

#### 産業上の利用可能性

上述したように本発明によれば、試料中の糖化タンパク質を測定するに際しFAOD(フルクトシルアミノ酸オキシゲナーゼ)と組み合わせて使用されるプロテアーゼが提供される。

本発明によれば、更に、糖化タンパク質を含有する試料にFAODを作用させる糖化タンパク質の測定方法であって、前記糖化タンパク質を酸性条件下でプロテアーゼ処理することを特徴とする糖化タンパク質の測定方法が提供される。

本発明によれば、更に、糖化タンパク質を含有する試料にプロテアーゼおよびFAODを作用させる糖化タンパク質の測定方法であって、前記プロテアーゼとしてアスペルギルス属(*Aspergillus*)由来のプロテアーゼを用いることを特徴とする糖化タンパク質の測定方法が提供される。

本発明によれば、更に、糖化タンパク質を含有する試料にプロテアーゼおよびFAODを作用させる糖化タンパク質の測定方法であって、前記プロテアーゼとしてプロテアーゼXIVを用いることを特徴とする糖化タンパク質の測定方

法が提供される。

上記した本発明の方法においては、糖化アルブミンの測定に適したF A O Dとの組み合わせにおいて有用な酵素作用を発揮する適切なプロテアーゼを用いることにより、高感度且つ正確に生体成分中の糖化タンパクを測定することができる。したがって、本発明によれば、糖尿病の症状の管理、予防に貢献し得る糖化タンパク質の測定方法、および前記方法に好適に使用可能なプロテアーゼが提供される。

更に、上記プロテアーゼとして入手が容易なもの（例えば、「スミチームM P」）を用いる態様によれば、臨床へのより広範な適用が容易となる。

加えて、酸性プロテアーゼを用いる本発明の態様によれば、p Hを調整することにより前記プロテアーゼの不活性化を簡便且つ迅速に行うことができ、臨床検査等への更に広範な適用が可能となる。

## 請求の範囲

1. 試料中の糖化タンパク質を測定するに際しF A O D（フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ）と組み合わせて使用されるプロテアーゼであって、至適pHを酸性側に有することを特徴とするプロテアーゼ。

2. アスペルギルス属（*Aspergillus*）により産生される請求項1記載のプロテアーゼ

3. 糖化タンパク質を含有する試料にF A O Dを作用させる糖化タンパク質の測定方法であって、前記糖化タンパク質を酸性条件下でプロテアーゼ処理することを特徴とする糖化タンパク質の測定方法。

4. 糖化タンパク質を含有する試料にプロテアーゼおよびF A O Dを作用させる糖化タンパク質の測定方法であって、前記プロテアーゼとしてアスペルギルス・メレウス（*A.melleus*）由来のプロテアーゼを用いることを特徴とする糖化タンパク質の測定方法。

5. 前記プロテアーゼが、至適pHを塩基性側に有する *A.melleus* 由来のプロテアーゼである請求項4記載の測定方法。

6. 前記 *A.melleus* 由来のプロテアーゼがスミチームMPである請求項5記載の測定方法。

7. 糖化タンパク質を含有する試料にプロテアーゼおよびF A O Dを作用させる糖化タンパク質の測定方法であって、前記プロテアーゼとしてプロテアーゼ XIV を用いることを特徴とする糖化タンパク質の測定方法。

8. 前記F A O DがF A O D-SまたはF A O D-Gである請求項2～7のいずれかに記載の測定方法。

9. 前記糖化タンパク質が、前記アルブミンである請求項2～7のいずれかに記載の測定方法。



図 1

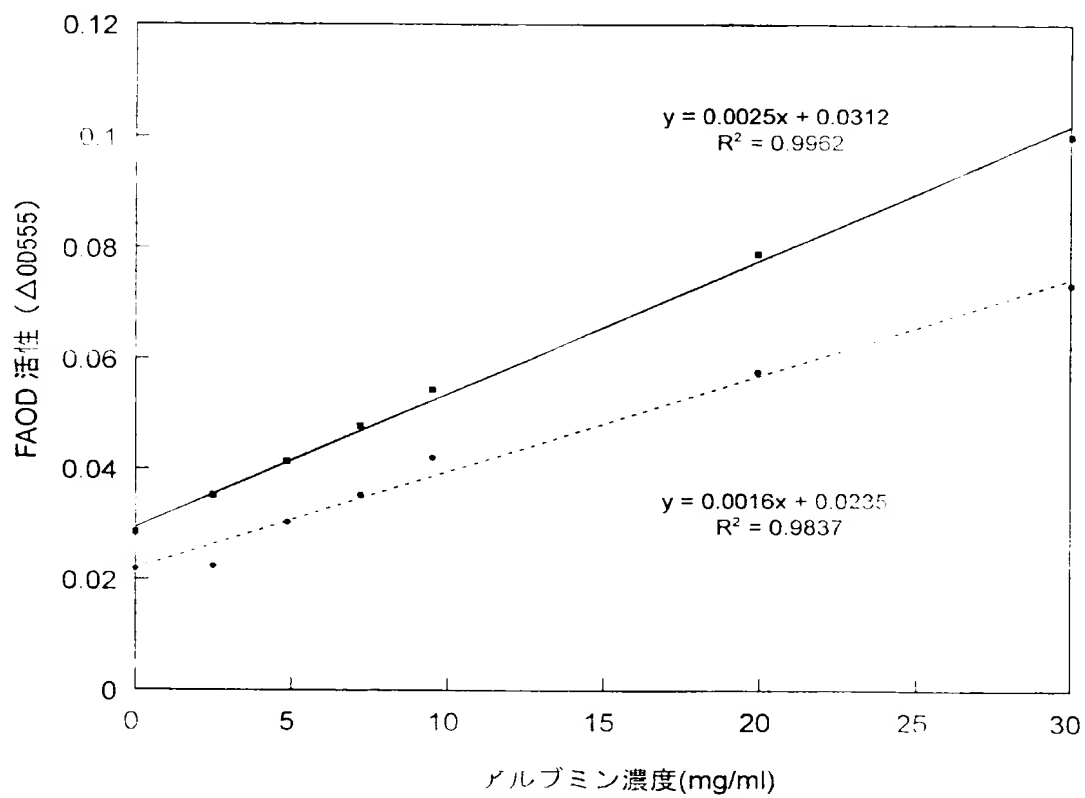


図 2

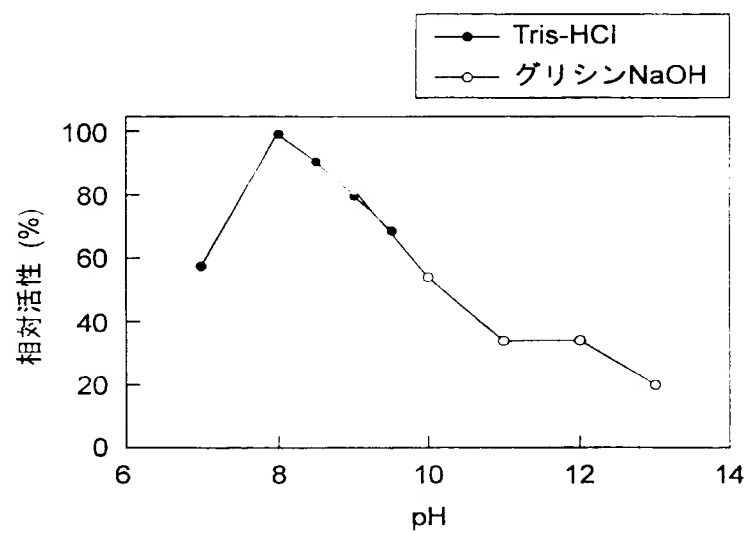


図 3

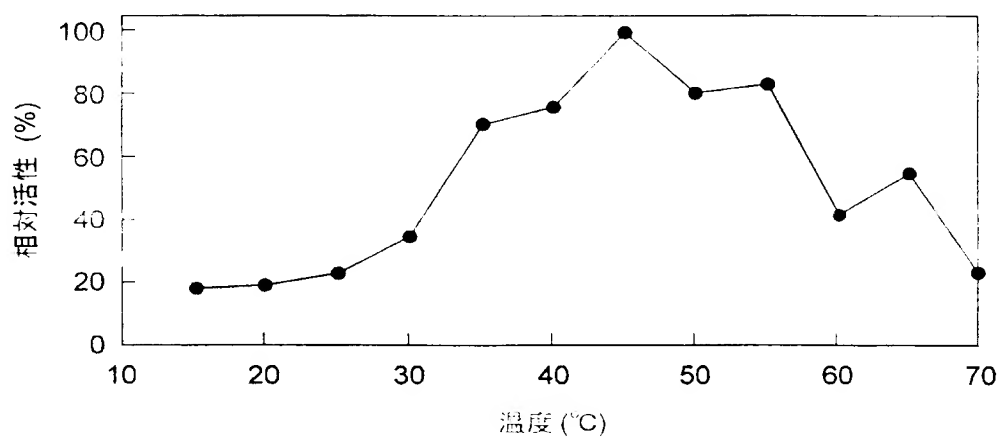


図 4

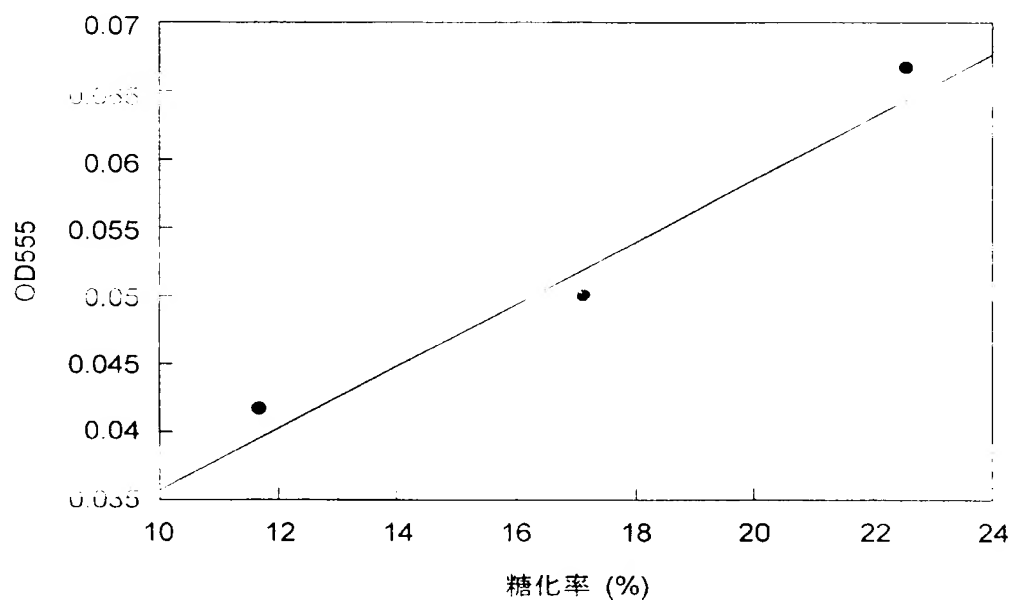


図 5

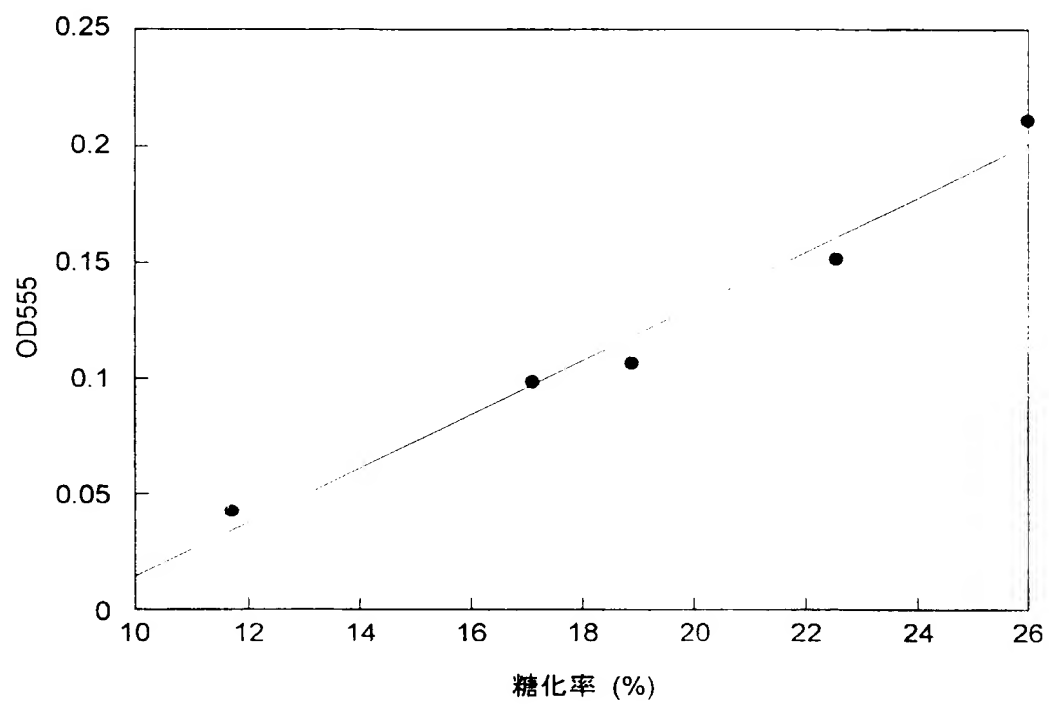


図 6

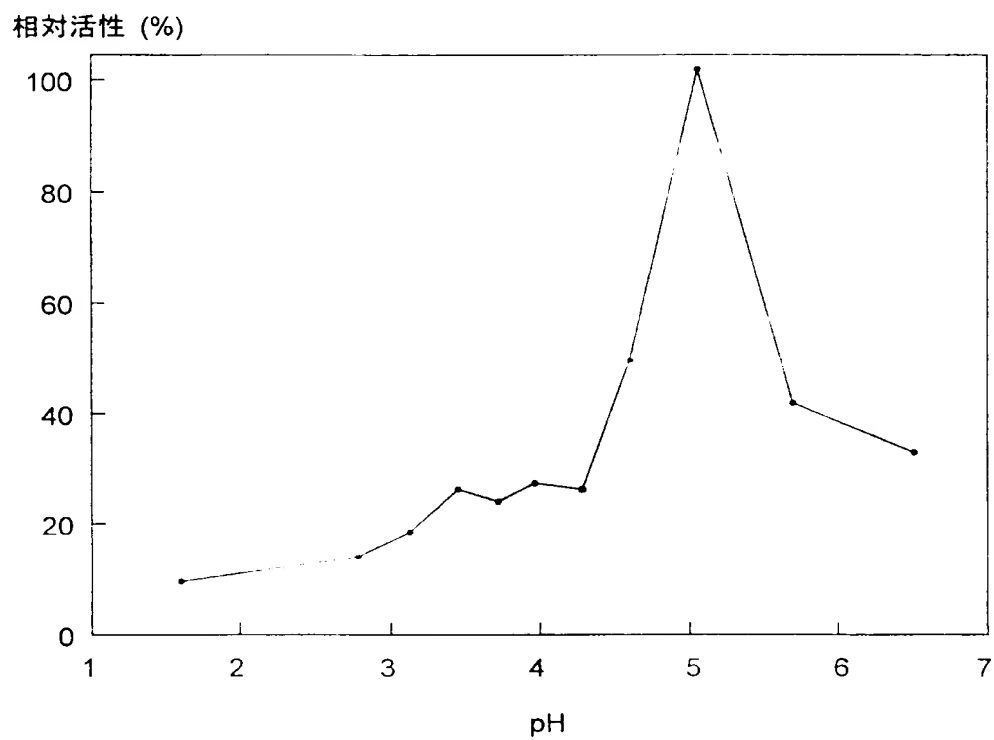


図 7

相对活性 (%)

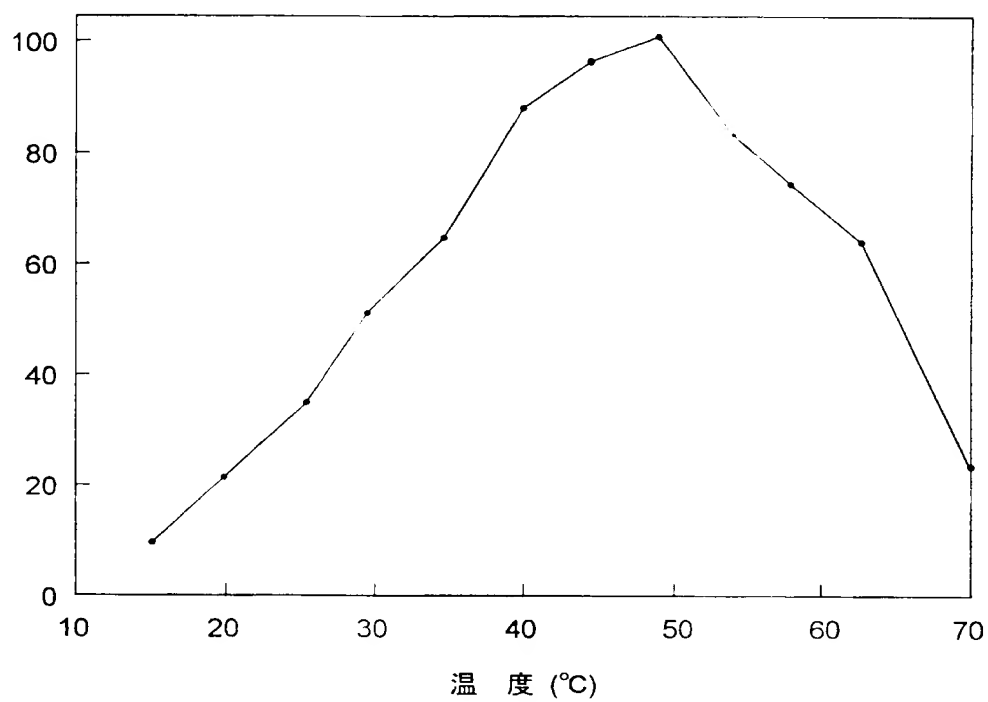
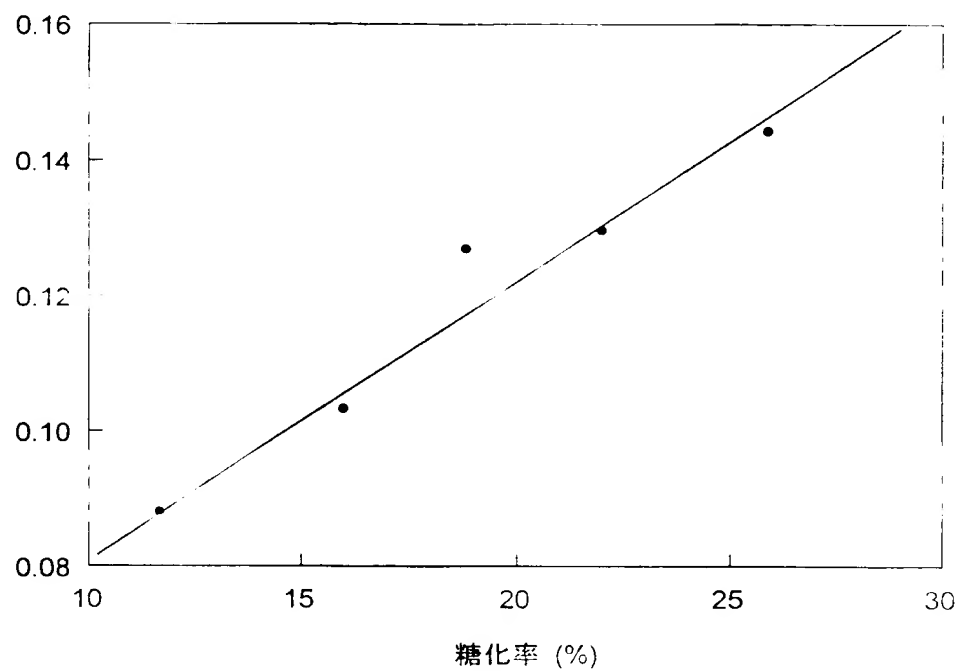


図 8

吸光度  
OD=555 nm





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/01904

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>6</sup> C12Q1/26, C12N9/62		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>6</sup> C12Q1/26, C12N9/62		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	LUISETTI M., "Some properties of the alkaline proteinase from <i>Aspergillus melleus</i> ." Int. J. Tiss. Reac., 1991, Vol. 13, No. 4, p.187-192	1, 2 5, 6
A	JP, 61-280297, A (Noda Institute for Scientific Research), December 10, 1986 (10. 12. 86) (Family: none)	3-9
A	JP, 5-192193, A (Genzyme Ltd.), August 3, 1993 (03. 08. 93) & EP, 526150, A1 & US, 5370940, A & DE, 69211439, A1 & AU, 9220457, A	3-9
A	JP, 7-289253, A (Kyoto Daiichi Kagaku Co., Ltd.), November 7, 1995 (07. 11. 95) & EP, 678576, A1	8
A	JP, 8-154672, A (Kyoto Daiichi Kagaku Co., Ltd.), June 18, 1996 (18. 06. 96) & EP, 709457, A1 & US, 5712138, A	3
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other document "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "<" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search August 17, 1998 (17. 08. 98)		Date of mailing of the international search report August 25, 1998 (25. 08. 98)
Name of the ISA Japanese Patent Office		Name of the ISA officer
Examiner		Examiner No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP98/01904

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>8</sup> C12Q 1/26, C12N 9/62		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>8</sup> C12Q 1/26, C12N 9/62		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	LUISETTI M., "Some properties of the alkaline proteinase from <i>Aspergillus melleus</i> ." Int. J. Tiss. Reac., 1991, vol. 13, no. 4, p. 187-192	1, 2 5, 6
A	JP, 61-280297, A (財団法人野田産業科学研究所) 10. 12月. 1986, (10. 12. 86) (ファミリーなし)	3-9
A	JP, 5-192193, A (ジェンザイム・リミテッド) 3. 8月. 1993, (03. 08. 93) & EP, 526150, A1 & US, 5370990, A & DE, 69211439, A1 & AU, 9220457, A	3-9
<input checked="" type="checkbox"/> 〇 欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの 「B」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用するもの (理由を付す) 「O」 11月による開示、使用、販売等に用いられるもの 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
「T」 日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であつて出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であつて、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であつて、当該文献と他の1以上の文献を組み合わせることで、当該発明と同一の組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 17. 08. 98		国際調査報告の発送日 25. 08. 98
国際調査機関の名称及び住所 特許庁審判部 (ISA/JP) 〒100-8914 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審判部 (権限) 審判部 審判部 〒100-8914 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 電話番号 03-3581-1101 内線 3449

PAGE 01 OF 210 (第2ページ) (19920674)

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 7-289253, A (株式会社京都第一科学) 7. 11 月, 1995, (07. 11. 95) & EP, 678576, A1	8
A	JP, 8-154672, A (株式会社京都第一科学) 18. 6 月, 1996, (18. 06. 96) & EP, 709457, A1 & US, 5712138, A	8